

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-255096

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 07 K 13/00

識別記号 庁内整理番号  
7731-4H  
8717-4B  
7236-4B

⑭ 公開 平成3年(1991)11月13日

C 12 N 15/00  
5/00 A  
B※

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全18頁)

⑮ 発明の名称 組換えラット肝実質細胞増殖因子

⑯ 特 願 平2-50643

⑰ 出 願 平2(1990)3月1日

特許法第30条第1項適用 平成元年9月20日、日本癌学会発行の「日本癌学会総会記事」に発表

⑱ 発 明 者 中 村 敏 一 福岡県福岡市東区みどりヶ丘3丁目11番6号

⑲ 発 明 者 西 澤 勉 神奈川県相模原市富士見3丁目3-607

⑳ 発 明 者 関 達 也 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬  
研究所内

㉑ 発 明 者 下 西 学 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬  
研究所内

㉒ 出 願 人 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

㉓ 出 願 人 中 村 敏 一 福岡県福岡市東区みどりヶ丘3丁目11番6号

㉔ 代 理 人 弁理士 高 島 一

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

組換えラット肝実質細胞増殖因子

2. 特許請求の範囲

(1) 組換えラット肝実質細胞増殖因子。

(2) ラット肝実質細胞増殖因子をコードする塩  
基配列を含有するDNA。

(3) ラット肝実質細胞増殖因子をコードする塩  
基配列を発現し得る組換え発現ベクター。

(4) ラット肝実質細胞増殖因子をコードする塩  
基配列を発現し得る組換え発現ベクターにより形質  
転換された形質転換体。

(5) ラット肝実質細胞増殖因子をコードする塩  
基配列を発現し得る組換え発現ベクターにより形質  
転換された形質転換体を培養し、該培養液から組  
換えラット肝実質細胞増殖因子を採取することを特  
徴とする組換えラット肝実質細胞増殖因子の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は肝実質細胞増殖活性を有するポリペプ

チド、さらに詳しくは、生体外(in vitro)で肝  
実質細胞の維持、増殖を可能にする生理活性を有  
する新規なポリペプチド、該ポリペプチドをコー  
ドするDNA、組換え発現ベクター、形質転換体、  
および該ポリペプチドの製造法に関するものであ  
る。

本発明のポリペプチドは肝実質細胞培養試薬、  
肝再生促進剤、肝機能の基礎的研究、成熟肝実質  
細胞に対する各種ホルモンや薬剤の作用の研究、  
肝臓の発癌研究用、さらに該ポリペプチドに対す  
る抗体を用いる臨床診断試薬などへの利用が期待  
出来る。

(従来の技術)

従来、細胞増殖活性を有するポリペプチドとし  
て、上皮細胞増殖因子(EGF)、線維芽細胞増  
殖因子(FGF)、神経細胞増殖因子(NGF)、  
血小板由来増殖因子(PDGF)、血管内皮細胞  
増殖因子(ECGF)などが知られている。これ  
らの細胞増殖因子の他に、生体外において成熟肝  
実質細胞増殖活性を有するポリペプチドが198

4年に中材らによって再生肝ラット血清より部分精製され、肝実質細胞増殖因子（以下HGFと略す）と命名された。

このHGFの発見まで肝実質細胞は、各種の分化能性が活発に増殖する哺乳動物血清の存在下でも肝細胞の増殖が全く認められず、通常約1週間では培養容器の壁からの脱落が起こり、生体外での長期培養は不可能であった。しかし、このHGFの存在下において肝細胞は極めて良好に増殖し、肝細胞の培養が可能となった（Biochem. Biophys. Res. commun., 122, 1450, 1984）。他の研究者によっても、このHGF活性は、肝部分切除手術後の血中、肝硬変患者の血中にも存在することが確認された。その後、多くの研究者によって精製法、化学的性質、生物学的性質が明らかにされたが、このHGFあるいはHGFと同様の肝細胞増殖活性を有するポリペプチドのアミノ酸組成を同定するまでには至らなかった。

このような状況の下で、本発明者らは、ラット血小版などの組織からHGFを分離精製して研究

を重ね、この血小版由来のHGFは、2種のサブユニットからなり、生体外において肝実質細胞を極めて良好に増殖させることを見出した。そしてこのHGFに含有される一部のアミノ酸配列27残基を同定することに成功した（特願昭63-311690号公報）。

〔発明が解決しようとする課題〕

生体内HGFは、肝臓、脳、胎盤、骨髄、心臓、胎盤、腎臓などの臓器あるいは血小板や白血球などの血液細胞などから極微量分泌されるポリペプチドであるため、原材料組織の入手、収量、安定供給など問題点が多い。このHGFを肝実質細胞の培養や肝細胞の研究用として利用するためには、その構造を明らかにしHGFあるいはHGFと同様の活性を有するポリペプチドを遺伝子組換え技術を用いて大量に供給することが望まれている。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、ラット肝臓mRNAより調製したcDNAライブラリーより、ラット血小版由来の

3

HGFのアミノ酸配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、ラットHGFポリペプチドをコードする塩基配列を含有するcDNAが得られることを見出した。さらに、該cDNAを含有する組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体を用い、該形質転換体を培養してラットHGF遺伝子が発現することを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は組換えラットHGF、ラットHGFをコードする塩基配列を含有するcDNA、該cDNAを発現し得る組換え発現ベクター、および該組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体および該形質転換体を培養してラットHGF遺伝子が発現することを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は組換えラットHGF、ラットHGFをコードする塩基配列を含有するcDNA、該cDNAを発現し得る組換え発現ベクター、および該組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体および該形質転換体を培養してラットHGF遺伝子が発現することを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は組換えラットHGF、ラットHGFをコードする塩基配列を含有するcDNA、該cDNAを発現し得る組換え発現ベクター、および該組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体および該形質転換体を培養してラットHGF遺伝子が発現することを見出し、本発明を完成させるに至った。

4

染色体DNAライブラリーを調製し、(2)構築した合成オリゴヌクレオチドプローブ、あるいは適切な標識したcDNAプローブを用いて、上記ラット由来、DNAライブラリーまたは染色体DNAライブラリーのスクリーニングを行い、単離されたクローンより目的とする1種または2種以上のcDNAまたは染色体DNAを抽出する。また、本発明によって明らかにされたDNA配列あるいはヒトや動物のHGFのアミノ酸配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドや本発明により得られたラットHGF cDNAやラットHGF染色体DNAなどをプローブに用い、またヒト又は動物のHGFに対する抗体を用い、直接ラットの臓器あるいは血液細胞などから抽出したmRNAより調製したcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、単離されたクローンより目的とするラットHGFのcDNAを抽出することをもって、(3)ラット由来HGFのcDNAよりラットHGFをコードするcDNA断片を制限酵素を用いて切り出し発現用ベクターに組み込み、(4)

5

得られた転換発現ベクターにより宿主細胞を形質転換して形質転換体を得、⑤この形質転換細胞を培養して、その培養上清から本発明のラットHGFを製造することが出来る。さらに形質転換細胞中の転換発現ベクターから制限酵素処理によって本発明のラットHGFをコードする塩基配列を含有するDNAを得ることが出来る。

以下、本発明の各工程について詳細に説明する。

(1) mRNAの単離とcDNAライブラリーの調製:

ラットのHGFをコードするmRNAはラット巨核球細胞、またはラット肝組織などから得ることが出来る。例えば、*Biochemistry*, 18, 5294 (1979)に記載されているJ. E. Chiraviraの方法によって、ラット巨核球細胞、またはラット肝組織のグアニジンチオシアン酸溶液から得たRNAをさらにオリゴ(dT)セルロースカラムを用いる液体クロマトグラフィーによって該mRNAを調製することが可能である。

また、ラット肝mRNAのような動物細胞や動物組織などの各種mRNAは市販品としてクロン

テック社などから購入して利用することも出来る。

これらのmRNAを鋳型として逆転写酵素やポリメラーゼ・チェーン・リアクション法(PCR)を用いて、例えば、Deavaraらの方法(*Mol. Cell. Biol.*, 2, 161, 1982, および*Mol. Cell. Biol.*, 3, 280, 1983)あるいはJ. Gullierらの方法(*Cere.*, 25, 263, 1983)あるいはM. A. Frohmanらの方法(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8998, 1988)に従ってcDNAを合成し、このcDNAをプラスミドやファージなどに組み込むことによりcDNAライブラリーを調製することが出来る。cDNAを組み込むプラスミドベクターとしては、大腸菌由来のpBR322(東洋紡績)、pUC18およびpUC19(東洋紡績)、枯草菌由来のpUB110(シグマ社)などがある。またcDNAを組み込むファージベクターとしては、 $\lambda$ gt10および $\lambda$ gt11(東洋紡績)などがある。これらのベクターは、宿主細胞内に保持されて複製、増幅されるものであれば、ここに例示したものに限定されるものではない。

7

mRNAを鋳型として合成されたcDNAをプラスミドまたはファージに組み込んでcDNAライブラリーを調製する方法として、T. Maniatisの方法(*Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 239)またはJ. V. Hyunhらの方法(*DNA Cloning: A Practical Approach*, 1, 49, 1985)を各々例示することが出来る。しかし場合によっては、mRNAと同様に各種のcDNAライブラリーを市販品としてクロンテック社などから購入することが出来るのでそれらを利用することも出来る。

(2) cDNAライブラリーのスクリーニング:

cDNAライブラリーとして得られたプラスミドやファージなどの転換ベクターは、大腸菌のような適切な宿主細胞に保持される。宿主となり得る大腸菌としては、例えば*Escherichia coli* NM514, C600(ストラタジーン社)、NM522, JM101(ファルマシア社)などを例示することが出来る。cDNAのベクターがプラスミドの場合、塩化カルシウム法、あるいは塩化カ

8

ルシウム・塩化ルビジウム法、またcDNAのベクターがファージの場合、インビトロパッケージング法などを用いてあらかじめ増殖させた宿主細胞に保持させることが出来る(*Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 249)。

このようにして得られた形質転換体から、ラットHGFの部分のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドを合成し、このオリゴヌクレオチドを<sup>32</sup>P標識したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーション法(*Gene*, 10, 63, 1980)、ブランクハイブリダイゼーション法(*Science*, 196, 180, 1977)などによってcDNAクローンを釣り上げることが出来る。また、目的とするポリペプチドに対する抗体を用いて、標識抗体法(*DNA Cloning: A Practical Approach*, 1, 49, 1985)によって、cDNAクローンをクローニングすることも可能である。このようにしてクローン化された形質転換体は、ラット由来HGFの全アミノ酸配列あるいはその部分のアミノ酸配列をコード

9

10

する塩基配列を有するcDNAを含有している。

特に該複製媒体から常法 (Recombinant Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982) に従ってプラスミドやファージなどの組換えDNAを単離し、そのまま、あるいは制限酵素で消化してからcDNA塩基配列が決定される。得られたラット由来HGFのcDNAの塩基配列は、マクサムとギルバートの化学法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560, 1977) やサンカーのジデオキシ法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5462, 1977) などによって決定される。さらに、必要があれば、記述のmRNAと塩基配列の決定されたcDNAの1部あるいはcDNAの1部の合成DNAをプライマーにしてプライマーエクステンション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 731, 1979) によって新たにcDNAを合成し、上記と同様にしてcDNAライブラリーから第1のcDNAに連結した第2のcDNAを含有するプラスミドやファージなどの組換えDNAをクローニングすることが可能である。このプライマーエク

ステンとクローニングの工程は、必要により複数回繰り返される。

### (3) ラットHGF組換え発現ベクターの構築

クローニングされたラットHGFのアミノ酸配列の全部あるいはその1部をコードするcDNAを含有する動物のプラスミドやファージなどの組換えベクターから制限酵素によってcDNAを切り出し、ラットHGFの発現に適したベクターのプロモーターの下流に制限酵素とDNAリガーゼを用いて再結合して組換え発現ベクターを構築することが出来る。

より詳しくは、本発明のラットHGFを効率良く発現させるために組換え発現ベクターは転写の方向に順着に(1)プロモーター、(2)リボソーム結合部位、(3)開始コドン、(4)本発明のラットHGFをコードする塩基配列を含有するDNA、(5)終止コドン、(6)ターミネーターを含むように構築される。

本発明で用いることが出来るDNAのベクターとして、大腸菌由来のプラスミドpBR322、pUC18 (東洋紡績)、枯草菌由来のプラスミ

### 1.1

pUB110 (シグマ社)、酵母由来のプラスミドpRB15 (ATCC37062) あるいはバクテリオファージλgt10、λgt11 (ストラタジーン社)、あるいはウイルスSV40 (BRL社)、BPV (ATCC VR-703)、レトロウイルスの遺伝子由来のベクター、更にジヒドロ葉酸還元酵素の遺伝子を含むベクターなどが列挙出来るが宿主内で複製・増殖可能なベクターであれば特に限定はない。特に、本発明のヒトHGFを簡便に発現させるには、SV40のようなウイルスの遺伝子由来のベクターを用いるのが好ましい。

例えば、前述のクローニングされたラットHGFをコードするDNAをSV40ベクターの後期領域に結合した組換え発現ベクターは、COS細胞 (Cell, 23, 175, 1981) と呼ばれるサル細胞株に導入して発現させることが可能である。

プロモーターおよびターミネーターに関しても、目的とするラットHGFをコードする塩基配列の発現に用いられる宿主に対応したものであれば特

### 1.2

に限定はない。例えば、プロモーターとして、宿主が大腸菌である場合、*lacZ*プロモーター、*lac*プロモーターなどを、宿主が枯草菌である場合、SP01プロモーター、SP02プロモーターなどを、宿主が酵母である場合、GAPプロモーター、PGKプロモーターなどを、宿主がマウス線維芽細胞やチャイニーズハムスター卵巣細胞のような動物細胞の場合、ウイルス由来のSV40プロモーター、H5V1-TKプロモーターなどを例示することが出来る。またターミネーターとしては、宿主が大腸菌の場合、*trp*ターミネーター、*ppd*ターミネーターなどを、宿主が枯草菌の場合、*amyE*ターミネーターなどを、宿主が酵母の場合、CYC1ターミネーターなどを、宿主が動物細胞の場合、SV40プロモーターやH5V1-TKプロモーターあるいはノタロチオネインプロモーターやヒートショックプロモーターなどを例示することが出来る。これらのプロモーターとターミネーターは用いる宿主に応じて適宜に組み合わせられる。

### 1.3

本発明のラット HGF をコードする塩基配列を含有する DNA は、その DNA が発現されるポリペプチドが、肝実質細胞増殖性を有するならば第 3 図に示した塩基配列に限定するものではなく、塩基配列の一部が置換、欠損、挿入、あるいはこれらが組み合わされた塩基配列を有する DNA であってもよい。本発明のラット HGF をコードする塩基配列を含有する該 DNA の翻訳開始コドンとして ATG、翻訳終止コドンとして TAA、TAG、あるいは TGA を有してもよい。また必要に応じて開始コドン、あるいは終止コドンをもつ以上組み合わせたり、他のコドンと組み合わせたりして配列してもよく、これらに特に限定はない。さらに、この組換え発現ベクターで形質転換した宿主の選択マーカーとなり得るアンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、DHFR 遺伝子など 1 種または 2 種以上が該ベクターの適切な位置に含有されていることが好ましい。

#### (4) 宿主細胞の形質転換とその培養：

このようにして構築されたラット HGF 組換え

発現ベクターは、コンビニント転染法 (J. Mol. Biol., 53, 157, 1971)、プロトプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1926, 1976)、サンシカル融合法 (Science, 221, 57, 1983)、DEAE 陽イオン法 (Science, 215, 165, 1982)、電気パルス法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7161, 1984)、インゼトロポメーター法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 581, 1975)、ウイルスベクター法 (Cell, 37, 1053, 1984)、またはマイクロインジェクション法 (Exp. Cell. Res., 159, 347, 1984) などによって宿主に導入され、形質転換体が発現される。このとき、宿主として既述の大腸菌の他に、枯草菌、酵母および動物細胞などが用いられる。特にマウス線粒体細胞 C127 (J. Virol., 25, 291, 1978) やチャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216, 1980) などの哺乳動物由来の宿主細胞を用いるのが好適である。

得られた形質転換体は、目的とする組換えラット HGF を産生させるためにその宿主に応じた適切

15

な培地中で培養される。培地中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物、ビタミン、血清および薬剤などが含有される。培地の例としては、形質転換体の宿主が大腸菌の場合、LB 培地 (日本製薬) M9 培地 (J. Exp. Med., Genet., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972, p. 431) などと、宿主が酵母の場合、YEPD 培地 (Genetic Engineering, vol. 1, Plenum Press, New York, 1979, p. 117) などと、宿主が動物細胞の場合、20%以下のウシ胎児血清を含有する MEM 培地、DMEM 培地、RPMI 1640 培地 (日本製薬) などとを挙げることが出来る。形質転換体の培養は、通常 20℃で 45℃、pH は 5~8 の範囲で行われ、必要に応じて通気、攪拌が行われる。また、宿主が接着性の動物細胞などの場合は、ガラスビーズ、コラーゲンビーズ、あるいはアセチルセルロースフローワイパーなどの担体が用いられる。これら以外の培地組成あるいは培養条件下でも形質転換体が生育すれば実施でき、これらに限定されるものではない。

17

16

い。

#### (5) ラット HGF の精製：

このようにして形質転換体の培養上清中または形質転換体中に生成した組換えラット HGF は、公知の塩析法、塩媒沈降法、透析法、ろ過法、ゲル電気泳動法、あるいはゲル透過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどを組み合わせて分離精製することが出来る。特に、硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィー、ヘパリンセファロースアフィニティクロマトグラフィー、およびフェニルセファロース逆相クロマトグラフィーの組み合わせ、あるいは硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィー、および抗 HGF 抗体セファロースアフィニティクロマトグラフィーの組み合わせなどが好ましく有効な精製法である。

以上述べた方法によって得られた新規な組換えラット HGF は、ラット肝およびラット血小板由来

18

HGFと高糖にラット肝実質細胞の増殖を顕著に促進する活性を示した。

(HGF活性の測定)

HGF活性は、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 7229 (1983) に記載の方法に準じて次のように測定した。ウイスター系ラットからコラーゲン層状性によって肝実質細胞を分離精製した。得られたラット肝実質細胞を5%ウシ血清、 $2 \times 10^{-4}$  M インスリンおよび $2 \times 10^{-4}$  M デキサメサゾンを含むウィリアムスE培地（フローラボラトリー社）に懸濁し、24ウエルマルチプレートに $1.25 \times 10^5$  個/ウエルの濃度で播いた。5% CO<sub>2</sub>、および30% O<sub>2</sub>、および65% N<sub>2</sub>の存在下、37℃で20時間培養後、0.1 μg/μlのアブソチニンを含むウィリアムスE培地に交換すると同時に所定量の被験試料を添加した。15時間後、1.5 μCi/μlの<sup>3</sup>H-デオキシウリジン10 μg/μl/ウエルを添加した。コントロール群には、<sup>3</sup>H-デオキシウリジン添加の15分前に5 μg/μlのアフィディコリンを添加した。さら

に20時間培養して<sup>3</sup>H-デオキシウリジン（<sup>3</sup>H-UDR）を2回洗浄後、存在<sup>3</sup>H-UDRをトリクロロ酢酸水溶液（TCA）で固定した。細胞を1ウエル当たり0.5 mlの1N水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマカウンターにより測定した。また放射能測定後の試料の一部をとり、ローリー法（J. Biol. Chem. 193: 265, 1951）に従い蛋白量を測定した。被験試料を添加したと肝実質細胞に取り込まれた<sup>3</sup>Hの量をコントロールとのカウントの差として求め、これをラット肝実質細胞蛋白質に相当するに換算して、DNA合成活性（dpm/μg蛋白質）とした。被験試料のHGF活性は、同一試験において上皮細胞成長因子（EGF）: 0.05 μg/μlを用いた時の肝実質細胞のDNA合成活性の50%に相当する活性を1単位と定義して表示した。

(発明の効果)

本発明によれば、肝実質細胞の生体外での増殖を可能とする新規な生理活性ペプチドが提供される。本発明の組換えラットHGFは、臨床診断試薬

19

として有用である。さらに本発明の組換えラットHGFの作用により増殖維持される肝実質細胞は、例えば肝機能の基礎的研究用、肝実質細胞に対する各種ホルモンや薬剤の作用の研究用、肝臓の発癌研究用、あるいは肝炎ウイルスの生体外培養のための宿主細胞として極めて有用である。

以下、本発明を実施例により、さらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

(実施例)

実施例1

(1)ラット肝臓mRNAの単離:

ラット肝臓mRNAは、グアニジンチオシアン酸塩（Biochemistry, 18, 5294, 1979）によって抽出し、オリゴdTセルロースカラムクロマトグラフィー法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1408, 1972）によって精製して調製した。市販食用植物油で希釈した20%四酸化炭素をSDラット100g当たり1mlを腹腔内投与した。四酸化炭素投与の10時間後、肝臓を摘出した。得られ

たラット肝臓0.50gに5.5Mグアニジウム塩液（5.5Mグアニジンチオシアン酸、25mMクエン酸、0.5%ラウリルサルコシナトリウムからなるpH7.0の溶液）: 5mlを加えてホモジナイズした。0.1M EDTAを含むセシウムトリフロロ酢酸溶液（1g/ml）17mlを上記のラット肝分散液16mlを重層し、ベックマン超遠心機、L8-55型によって85000×g、22時間、20℃の条件下で遠心分離した。DNA層を除去した後、沈降したRNA層を1mlの滅菌した蒸留水に溶解した。このRNA水溶液から冷エタノール沈降によって6.24μgのRNAを得た。得られたRNAを1mM EDTAを含む10mMトリス塩緩衝液、pH7.5（以後TE緩衝液と略す）、0.5mlに溶解し、65℃、5分間、加熱処理した後、1M NaCl 0.5mlを加えた。0.1N NaOHで活性化した後、0.5M NaClおよび1mM EDTAを含む10mMトリス塩緩衝液（STE緩衝液と略す）で平衡化したオリゴdTセルロースカラムにRNA溶液0.5mlを注入し

20

21

—970—

22

た。約5μlのS・T・E緩衝液で洗浄後、T・E緩衝液で吸着したポリ(A)RNAを溶出した。このポリ(A)RNA溶液500μlからホエータノール沈殿で得られたポリ(A)RNAは、再びT・E緩衝液に溶解し、1μg/μlの濃度に調整した。

#### (2) ラット肝由来のcDNAライブラリーの作製

上記(1)で得られたポリ(A)RNA、5μlを総型としてcDNA合成システム・プラス(アマシャム社)を用いてGublerらの方法(Gene., 25, 253, 1983)に準じてcDNAを合成した。1本鎖cDNAの収量は、1016ng、2本鎖cDNAの収量は、1729ngであった。この2本鎖cDNAは、フェノール/クロロホルム(1:1, v/v)抽出とエタノール沈殿によって精製した後、S・T・E緩衝液に溶解し、約0.7μg/20μlの濃度に調整してから使用するまで-20℃で保存した。このcDNAは、cDNAクローニングシステムλgt10(アマシャム社)を用いてHayashらの方法(DNA Cloning I, a practical approach, J., 49, 1982)に準じ、次のようにλg

110のBamHI・RsaI部位にクローニングした。BamHI・RsaI酵素を用いて上記のcDNA溶液の末端を処理した後、T4 DNAリガーゼを用いてcDNAの両末端にBamHI・RsaIリンカーを付加した。過剰のリンカーをBamHIで消化し、約100μlの反応液を得た。S・T・E緩衝液で平衡化したcDNA精製用ゲル透過カラムに上記反応液100μlを注入した。S・T・E緩衝液で溶出してcDNAを500μlを集めた。常法によってエタノール沈殿を2回繰り返した後、減圧乾燥してリンカー付加cDNAを得た。再び、S・T・E緩衝液に溶解して50ng/μlのリンカー付加cDNA 2.6μlを調整した。あらかじめ準備されたλg110アーム1μlにリンカー付加cDNA 0.1μlをT4 DNAリガーゼを用いて挿入した。この反応液はホエータノール処理した後、軽く乾燥し、得られた組換えcDNAの全量を5μlのT・E緩衝液に溶解した。この組換えcDNAをインビトロパッケージング反応に供し、λg110組換えファージを得た。ファージプレートイング用

2 3

大腸菌を用いたタイトレーションにより測定したcDNA 1μgから得られた組換えファージ数は、 $5.0 \times 10^8$ 個であった。このようにして作製したcDNAライブラリー(1)は、使用するまで少量のクロロホルムを加えたS・M緩衝液(100mM NaCl, 10mM MgSO<sub>4</sub>, および0.01%ゼラチンを含む20mMトリス塩酸緩衝液, pH 7.5)中、4℃で保存した。

#### (3) DNAプローブの合成:

特開昭63-311866号公報に記載のラットHGFβ遺伝子N末端アミノ酸配列15個をコードする塩基配列を推定し、オリゴヌクレオチド 5'-ACCATCCAICCTACIGTIGT: TGTCTGGGATATCCCTTTACIACCT (Iはイノシンを意味す)

をDNAシンセサイザー381A(アプライドバイオシステムズ社)により合成した。得られたオリゴヌクレオチドをT4ポリヌクレオチドキナーゼ(東洋紡績)を用いて[γ-<sup>32</sup>P]ATP(アマシャム社)により標識してDNAプローブを作製

2 4

した。

#### (4) ラットHGFβ遺伝子DNAの単離とその塩基配列の決定

上記(2)で得られた約 $5 \times 10^8$ 個の組換えファージを37℃で15分間約 $8 \times 10^8$ 個の大腸菌NM514(ストラタジーン社)に感染させた後、約50℃に加温した0.7%の寒天を含むLB培地270μlに添加し、23cm×23cmのLB寒天培地プレート5枚に均一に流延した。空気中、37℃で12時間培養後、プラークの生じたプレート上にニトロセルロースフィルターを約30秒間密着させた。このニトロセルロースフィルターを1.5M NaClおよび0.1N NaOHからなるアルカリ溶液に5分間浸漬し、さらに0.2M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)、2.5mMリン酸緩衝液(pH 7.5)、2mM EDTAおよび2×SSC緩衝液からなる中性溶液に15分間浸漬した。置換後、80℃、2時間熱処理してニトロセルロースフィルターに各プラークのDNAを固定化した。得られたニトロセルロースフィルターは、6×S

2 5

—971—

2 5

5.0 mM Tris-HCl 緩衝液、5.0 mM EDTA 緩衝液、および 0.01 M リン酸緩衝液、pH 7.0 からなるハイブリダイゼーション溶液に浸漬し、65°C で 5 時間前処理した。100°C で 5 分間熱処理した上記 (3) の  $^{32}$ P 標識合成オリゴヌクレオチド (約  $3 \times 10^4$  cpm) プローブと入基質 cDNA (0.1  $\mu$ g/反応) の混合溶液を加し、45°C で 16 時間ハイブリダイゼーション反応を行った。反応後、ニトロセルロースフィルターは 50°C で 0.1% SDS を含む 6×SSC 緩衝液によって 3 回洗浄してから風乾した。このニトロセルロースフィルターを増感スクリーン、ライティングプラス (デュボン社) と X 線フィルム、RX (富士写真フィルム) に密着させ、-80°C で 30 時間露光した。得られた 3 個の陽性ブランクを採取し、上記と同じ方法によって 2 次スクリーニングを行い、得られた 1 個の陽性クローンを RBC1 と命名した。この RBC1 ファージを常法により増殖させ、RBC1 cDNA を単離精製、制限酵素、切断解析および塩基配列解析に供した。得られた cDNA

A の塩基配列は、シーカワース (コナイン) スター・ノボケミカル社) を用いてジデオキシシタリドによって決定した。第 1 図 a に RBC1 cDNA の制限酵素地図、第 2 図 a に RBC1 cDNA の塩基配列を示す。RBC1 cDNA は、ラット HGF の cDNA をコードする塩基配列 (1 番目から 699 番目) を含有する。つまり RBC1 cDNA に含有する 1' A A A T C C T C C A T A T T C T T C T C の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを DNA シンセサイザー 3B1A (アプライドバイオシステムズ社) により合成した。この合成 cDNA 0.5  $\mu$ g をプライマーとし、(1) で調製したラット HGF cDNA 2.0  $\mu$ g を鋳型として cDNA 0.4  $\mu$ g を合成し、同様にして cDNA ライブラリー (E) を調製した。cDNA 1  $\mu$ g から  $2 \times 10^4$  の記憶ファージを得た。マルチプライド DNA 標識システム (アマシュー社) を用いて  $^{32}$ P-dCTP で標識した特開平 1-142697 号記載の HAC19 cDNA (その制限酵素地図は第 3 図に示す通りである) の 0.3 kb

27

EccRII 断片をプローブにして、cDNA ライブラリー (E) の 1 次スクリーニングおよび 2 次スクリーニングを行ない、陽性クローン RAC3 を得た。RAC3 ファージから常法により単離・精製した RAC3 cDNA を制限酵素切断解析および塩基配列解析に供した。第 1 図 b に RAC3 cDNA の制限酵素地図、第 2 図 b に RAC3 cDNA の塩基配列を示す。このようにして得られた RBC1 cDNA および RAC3 cDNA の塩基配列を組み合わせたラット HGF コード領域の全塩基配列およびその塩基配列から演算されるアミノ酸配列を第 4 図に示す。ラット HGF の全 cDNA 塩基配列から、ラット HGF の翻訳開始コドンは 1 番目の A T C であり、終止コドンは 2185 番目の T A A と推定される。これらの開始および終止コドンの間のラット HGF の cDNA 塩基配列は 728 アミノ酸残基からなるポリペプチドをコードし、1 番目の Met に続くアミノ酸配列は Leu に富み、30 番目の Ala までが HGF 分泌のためのシグナル配列と推定される。ラット

28

HGF  $\alpha$  鎖の N 末端は、ラット HGF  $\alpha$  鎖のアミノ酸配列の解析から 56 番目の Pro と推定される。同様に、ラット HGF  $\beta$  鎖の N 末端は、456 番目の Val と推定される。またラット HGF の糖鎖の結合部位は、Asn-x-Ser/Thr のアミノ酸配列を有する 295 番目、403 番目、569 番目、および 656 番目の Asn と推定される。

第 4 図に示すラット HGF のアミノ酸配列をコンピュータによりホモロジー検索を行った結果、ラット HGF はプラスミノーゲン、プラスミン、カリキレインや凝固因子 XII などのセリンプロテアーゼとホモロジーを持つことが見出された。即ち、ラット HGF はその  $\alpha$ -鎖にクリングル構造と推定される配列を 4 箇所持っており、またその  $\beta$ -鎖は上記セリンプロテアーゼのプロテアーゼ領域に類似している。しかし、セリンプロテアーゼの活性中心と推定されている Ser と His がラット HGF の  $\beta$ -鎖では Tyr (676 番目) と Glu (535 番目) にそれぞれ置換されてい

29

30



る。

(5) サルCOS細胞用ラットHGF発現ベクターの構築

サルCOS細胞用ラットHGF発現ベクターpEUK(rHGF1)の構築図を、第5図に示す。上記(4)で得られたRAC3ファージDNAを制限酵素BglIIとXhoIで消化し、アガロース電気泳動により0.7 kbのDNA断片を分離精製した。制限酵素BamHIとXhoIであらかじめ消化したブルースクリプトSKM13- (ストラタジーン社)と0.7 kb DNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼにより結合してプラスミドpBSRH1を得た。また別にRAC3ファージDNAを制限酵素XhoIとEcoRIで消化し、アガロース電気泳動により0.4 kbのDNA断片を分離精製した。制限酵素XhoIとEcoRIであらかじめ消化したブルースクリプトSKM13+と0.4 kb DNA断片を混合し、T4リガーゼにより結合してプラスミドpBSRH2を得た。このプラスミドpBSRH2をEcoRIで消化

し、阻害性アルカリフォスファターゼ(BAP)でリン酸基を除去した部位に、上記(4)で得られたRAC3ファージDNAを制限酵素EcoRIで消化して、得られた1.4 kb DNA断片をT4 DNAリガーゼによって挿入しプラスミドpBSRH3を得た。次に、プラスミドpBSRH3を制限酵素XbaIとXhoIで消化し、アガロース電気泳動により0.7 kb DNA断片を分離精製した。残存のプラスミドpBSRH3を制限酵素XhoIとBamHIで消化し、1.8 kb DNA断片を分離精製した。制限酵素XbaI、BamHIであらかじめ消化したブルースクリプトSKM13- (ストラタジーン社)と0.7 kb DNAおよび1.8 kb DNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼにより結合してプラスミドpBS(rHGF1) (発明調査第11051号)を得た。得られたpBS(rHGF1)を制限酵素XbaIとBamHIで消化し、2.5 kb DNA断片を得た。制限酵素XbaIとBamHIであらかじめ消化した細胞用発現ベクターpEUK-C1(クローンテ

## 3.1

ック社)と2.5 kb DNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼで結合してラットHGF発現ベクターpEUK(rHGF1)を得た。

(6) サルCOS細胞の形質転換とラットHGF遺伝子の発現

得られたpEUK(rHGF1)プラスミドをエタノール沈着した後、10 mM PBS緩衝液に溶解し、20  $\mu$ g/mlに調整した。次に、10% ウシ胎児血清(ギブコ社)を含むMEM培地(日本製薬)中で増殖させた対数増殖期のCOS-1細胞(ATCC CRL-1650)を10 mM PBS緩衝液で2回洗浄した後トリプシン処理した。同緩衝液で3回洗浄後、細胞濃度 $2 \times 10^5$ 個/mlになるように再び同緩衝液に浮遊化した。先に調整したプラスミド溶液250  $\mu$ lと細胞浮遊液250  $\mu$ lを混合し、氷浴中で10分間放置した。この氷浴したプラスミド・細胞混液に高電圧パルス遺伝子導入装置ZA-1200(PDS社)を用いて、印加電圧4 kV/cm、パルス時間20ミリの条件下で高電圧パルスかけた。得

## 3.2

られた細胞を上記の培地で希釈し、37℃、5% CO<sub>2</sub>存在下に3日間培養した。培養3日目の培養上清中のHGF活性を前述のラット肝実質細胞を用いて測定したところ、3.2単位/mlであった。一方、HGF cDNAを挿入していない発現ベクター、pEUK-C1を同じ方法によりCOS-1細胞に導入して培養したが、その培養上清中には、HGF活性を認めなかった。

## 実施例2

(1) マウスC127細胞用ラットHGF発現ベクターの構築

マウスC127細胞用ラットHGF発現ベクターpBPMT(rHGF1)の構築図を、第6図に示す。プラスミドpBPMTを制限酵素EcoRVで消化後、阻害性アルカリフォスファターゼ(BAP)でリン酸基を除去した部位に、実施例1で得られたプラスミドpBS(rHGF1)を制限酵素XbaIとBamHIで消化した4 DNAオリメラーゼで平端末端とした後、アガロース電気泳動により分離・精製した2.5 kbのDNA

断片をT4 DNAリガーゼにより挿入した。得られたラットHGF発現ベクターpBPMTrHGF1)は、MT-1プロモーターとSV40初期遺伝子のポリ(A)付加シグナルの間にラットHGF遺伝子を有し、この発現ベクターによるマウスC127細胞の形質転換は、ウシパピロマウイルス(BPV)により可能となる。また形質転換された細胞の選択は、トランスポゾンTn5のneo遺伝子(Gene, 19, 327, 1982)にヘルペスシンプレックスウイルスタイプ1のチミジンキナーゼ(HSV-1 TK)遺伝子由来のプロモーターとポリ(A)付加シグナルを連結したneoキメラ遺伝子によって可能となる。

(2)マウスC127細胞の形質転換とラットHGF遺伝子の発現:

ラットHGF発現ベクターpBPMTrHGF1)は、Miglerらの方法(Cell, 11, 223, 1977)によりマウスC127細胞へ導入した。

上記(1)で得られた20μgのpBPMTrHGF1)プラスミドを240μlの0.5M塩化

カルシウム240μlに溶解し、20mM HEPES、200mM NaClおよび1.5mMリソ酸ナトリウムからなる2×HDFBS緩衝液(pH7.1)に240μlを攪拌しながら加えた。室温で30分置料を続けプラスミドとリン酸カルシウムの共沈殿を形成させた。あらかじめ、10%ウシ胎児血清(ギブコ社)および8mMグルタミンを添加したDMEM培地(日本製薬)を用いて5×10<sup>6</sup>個のC127細胞を5%CO<sub>2</sub>の存在下で37℃、24時間培養した。培地交換した後、プラスミドとリン酸カルシウム共沈殿を加え、室温で20分放置した。さらに37℃で4時間インキュベートした後、培地を除去し、15%グリセリンを添加した1×HEPES緩衝液を加え室温で5分放置した。培地で細胞を洗浄した後、培地交換し、さらに37℃で2日間インキュベートした。細胞を10倍に希釈して1ml/瓶のG418(シグマ社)を含む同培地を用いて5%CO<sub>2</sub>の存在下で37℃、7日間培養して形質転換細胞を得た。得られた細胞株から培養上清中のHGF

35

活性の高い細胞を限界希釈法でスクリーニングしラットHGF高産生株BPR77を得た。この細胞の培養上清中のHGF産生量は、1.5万単位/μl/日であった。

### 実施例3

(1)チャイニーズハムスターCHO細胞用ラットHGF発現ベクターの構築

チャイニーズハムスターCHO細胞用ラットHGF発現ベクターpEVMTrHGF1)の構築図は、第1図に示す。プラスミドpEVMTrHGF1)を制限酵素EcoRVで消化後、緩衝性アルカリフォスファターゼ(BAP)でリン酸基を除去した部位に、実施例1で得られたプラスミドpBS(rHGF1)を制限酵素XbaIとBamHIで消化し、T4DNAポリメラーゼで平滑末端とした後、アガロース電気泳動により分離・精製した2.5kbのDNA断片をT4DNAリガーゼにより挿入した。得られたラットHGF発現ベクターpEVMTrHGF1)は、MT-1プロモーターとSV40の初期遺伝子のポリ(A)付加シ

36

グナルの間にラットHGF遺伝子を有する。また、形質転換された細胞の選択は、マウスDHFR遺伝子にSV40初期プロモーターとポリ(A)付加シグナルを連結したジヒドロ葉酸還元酵素キメラ遺伝子(DHFR)により可能となる。

(2)チャイニーズハムスターCHO細胞の形質転換とラットHGF遺伝子の発現:

ラットHGF発現ベクターpEVMTrHGF1)は、実施例2と同様にしてチャイニーズハムスターCHO細胞のDHFR欠損CHO-DUKX細胞に導入した。得られた細胞株は、リボスクレオシドとデオキシスクレオシドを含まず、選択した10%ウシ胎児血清(ギブコ社)と1%グルタミンと50nMメソトレキセートを含むα-MEM培地(フローラボラトリー社)を用いて、培養上清中のHGF活性の高い細胞を限界希釈法でスクリーニングした。発生したコロニーは、安定なラットHGF高産生株を得るために、同培地において7世代まで増殖させた。その結果、安定なラットHGF高産生株EVR26を得た。この

37

38

細胞のラットHGF産生能は、2.3万単位/1/日であった。

#### 4. 図面の簡単な説明

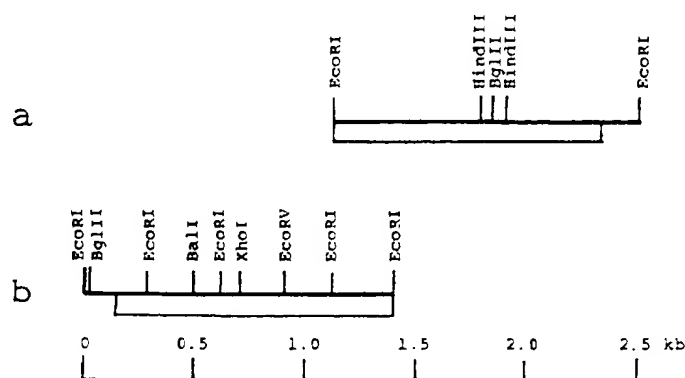
第1図は、RBC1 cDNAの制限酵素地図およびRAC3 cDNAの制限酵素地図を示す。第2図は、RBC1 cDNAの塩基配列の図及びRAC3 cDNAの塩基配列の図を示す。第3図はHAC19 cDNAの制限酵素地図を示す。第4図は、ラットHGFコード領域の全塩基配列とアミノ酸配列を示す。第5図は、サルCOS細胞用ラットHGF発現ベクターの構築図を示す。第6図は、マウスC127細胞用ラットHGF発現ベクターの構築図を示す。第7図は、チャイニーズハムスターCHO細胞用ラットHGF発現ベクターの構築図を示す。

特許出願人 東洋紡績株式会社

代理人 弁理士 高 島



39



第1図

第 2 頁 b

121 AG ATCTTTCAG  
 61 TTATCAGAC AACAACTTA CTCATCGCA ATAAAGCAG CTCAGACAG AGCGCTTTC  
 1 AACAGATTC TTTCAGGCG GCATCTCTG CAGACGATC AGCTCTCTG AACCTCAGC  
 60 ATCATCTGG GCAGCAACT TTCTCGCTG CTCTCTCTG AGCTCTCTG CTCTCAGCTC  
 120 CTCTCTCTG CTCTCAGCTT CCGTATCGA GAGCGAGCA AGAGAGAGC AATCTCTT  
 180 CATGATTTA AATCTCAGC AATCTCTT CTTCAGC AGAGCTAT ACTGAGAT  
 240 AAGCGAAA AGCTCAGCT TCGCAGCAG TCTCGAGCA GCTCAGCTC AAGCAGGCG  
 300 TTCTCATCA CTTCAGGCG CTCTCTTT GATAAGTGA CAAGAGATC CTACTCTAT  
 360 CTTTCATA CTATCTAG TCGAGTGA AAGCTTTC CCGATTAAT TGACTCTAT  
 420 CAAGCAGC ACTATATG AATCTCAG CTCTCTAG CAGCGAGCTA TAAAGGACA  
 480 CTATCATCA CTAGAGTGG CATCGCTG CAGCTTGA ATTCTATG CCGCTCAG  
 540 CAGAGCTTT TCTCTTCAG CTATCGCT AAGAGCTAG AGAGAACTA CTCTCAGT  
 600 CTCTCAGGCG AAGAGGCG AGCTCTGTT TTCTCAGCA ATCTCAGCT AGCTCAGCA  
 660 CTCTCTCAG TTCTCTCTG TTCTCAGCTT GATCTCTA CTCTCAGC TAAAGCTAG  
 720 AGAGTGA TCTCTCAGC AGAGTCTAG AGAGATCT AGCTCTGCA TCGAGAGCA  
 780 CCGAGGCG AGATTTT CCGAGAGCA TATCTCAGC AGCTCTTGA TGTATTTAT  
 840 TCTCTCAG CCGATCTGA CCGAGGCG TCTCTCAG CTCTCTCAG TCGAGCTCT  
 900 TCTCTCTT GTCATTTA AATCTCTG CAGCTCTG TCAATCTAG TCAATCTCT  
 960 ATGAGCAG CTGATTTA AAGAGGCG GAGAGCTT AGAGGAGC CAGCTCTAG  
 1020 ATTCTCTG GATCTCTG TCGAGCTG CATCTCTG AGCTCTCAG CTCTCTCAG  
 1080 ACTCTCAG ACTCTCTG CAGAGCTT AGAGATTT ATTCTCTG TCTCTCTG  
 1140 CTGAGTCT GATCTCTT TACTCTG CCGAGCTG GATCTCTG CTCTCTCAG  
 1200 ATTCTCTG CTCTCTG AGCTCTCAG GATCTCTG TCTCTCTG GAGAGCTAG  
 1260 ATCTCTCT TATCTCTG AGCTCTCAG CTCTCTG CAGCTCTG GAGAGCTAG  
 GAGCTCT

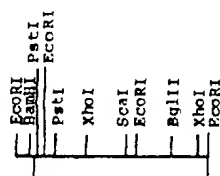
第 2 頁 a

481 GAAT CCGCTCAG CTCTCTCT CCGCTCTG  
 421 CAGAGCTG AGCTCTCT CCGAGCTG AGCTCTCT AATCTCTG  
 361 CCGAGCTG AGCTCTCT AATCTCTG TCTCTCTA CTCTCTCT CATCTCTG  
 301 GATCTCTG CTCTCTCT CAGCTCTG CTCTCTCT GATCTCTG TCTCTCTG  
 241 AATCTCTG ACTCTCTG CAGCTCTG AATCTCTG CTCTCTCT AATCTCTG  
 181 TCGAGCTG AATCTCTG TCTCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG CAGCTCTG  
 121 TCTCTCTG AATCTCTG GAGCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG  
 61 GAGCTCTG TCTCTCTG GATCTCTG CAGCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 1 CAGCTCTG TCTCTCTG CAGCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 60 GATCTCTG CAGCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 120 TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 180 TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 240 TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 300 TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 360 TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 420 TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 480 TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 540 TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 600 TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 660 TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 720 TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 780 TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG  
 840 TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG TCTCTCTG TCTCTCTG AATCTCTG

## 第 4 図(1)

ATG ATG TGG GGC ACC AAA CTT CTG GCG CTC TTC CTC CAG CAT GTC 48  
Met Met Trp Gly Thr Lys Leu Leu Pro Val Leu Leu Gln His Val 15  
1  
CTG CTC CAC CTC CTC CTT CTT GTC ACC ATC GCG TAT GCA GAA GGA 96  
Leu Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Val Thr Ile Pro Tyr Ala Glu Gly 30  
25  
CAG AAG AAG ACA AGA AAT ACT CTT CAT GAA TTC AAA AAG TCA GCA AAA 144  
Gln Lys Lys Arg Arg Asn Thr Leu His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys 45  
35  
ACT ACT CTT ACC AAG GAA GAG CCA TTA GTC AAG ATT AAA ACC AAA AAA 192  
Thr Thr Leu Thr Lys Glu Asp Pro Leu Val Lys Ile Lys Thr Lys Lys 60  
50  
GTC AAG TCT GCA GAT GAG TGT GGC AAG AGC TGC ATT AGA AAG AAG GGC 240  
Val Asn Ser Ala Asp Glu Cys Ala Asn Arg Cys Ile Arg Asn Lys Gly 75  
65  
TTT CCA TTC ACT TGC AAG GGC TTT GTT TTT GAT AAG TGC AGA AAA GCA 288  
Phe Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ser Arg Lys Arg 90  
85  
TGC TAC TGG TAT CTT TTC AAT ACT ATG TCA ACT GGA CTG AAA AAA GGG 336  
Cys Tyr Trp Tyr Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Gly 110  
100  
TTT GGC CAT GAA TTT GAC CTC TAT GAA AAG AAA GAC TAT ATT AGA AAT 384  
Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn 125  
115  
TGC ATC ATT GGT AAA GCA GGC ACC TAT AAG GGC ACA GTA TGC ATC ACT 432  
Cys Ile Ile Gly Lys Lys Gly Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr 140  
130  
AAG ACT GGC ATC AAG TGC CAG CTT TGG AAT TCC ATC ATC GGC CAT GAA 480  
Lys Ser Gly Ile Lys Cys Glu Pro Trp Asn Ser Met Ile Pro His Glu 155  
145  
CAG AAG TTT TTT CTT TGC AGC TAT GCG GGT AAA GAC CTA CAG GAA AAG 528  
His Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Glu Glu Asn 170  
165  
TAC TGT CGA AAT CTT CGA GGC GAA GAA GGC GCA CTT TGC TGT TTC ACA 576  
Tyr Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Gly Pro Trp Cys Phe Thr 185  
180

第 4 図(2)の続き



## 第 3 図

1 kb

## 表 4 22(2)

ACC AAT CCA GAG GTA CCG TAC GAA GTC TGT TGT GAC ATT CTT CAG TGT TCA Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Glu Cys Ser 195 200	624
GAA GTT GAA TGC ATG ACC TGC AAC GGT GAA AGC TAC AGA GGT CCG ATG Glu Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Pro Met 210 215	672
GAT CAC ACA GAA TCA GGC AAG ACA TGT CAG CCG TCG GAT CAG CAG ACA Asp His Thr Glu Ser Gly Lys Thr Cys Glu Arg Trp Asp Glu Glu Thr 225 230	720
CCA CAC CCG CAG AAA TTC TCG CCG GAA AGA TAT CCG CAG AAG GGC TTT Pro His Arg His Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe 245 250	768
GAT GAT AAT TAT TGC CCG AAT CCG GAG CCG ACG CCA TCG TCG Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro 265	816
TAC ACT CTT GAC CCG GAC ACC CCG TCG GAG TAT TGT GCA ATT AAA ATG Tyr Thr Leu Asp Pro Asp Thr Pro Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Met 275 280	864
TGC GCT CAC ACT GCT GTC AAT GAG ACT GAT GTT CCG ATG GAA ACA ACT Cys Ala His Ser Ala Val Asn Glu Thr Asp Val Pro Met Glu Thr Thr 290 295	912
GAA TGT ATA AAA GGC CAA GGA GAA GGT TAC AGC GCA ACC ACC AAT ACC Glu Cys Ile Lys Gly Glu Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Thr Asn Thr 305 310	960
ATT TGG AAT GCA ATT CCG TGT CAG CCG TCG GAT TCG CAG TAC CCG CAC Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Glu Arg Trp Asp Ser Glu Tyr Pro His 325 330	1008
AAG CAT GAC ATC ACT CCG GAG AAC TTC AAA TCG AAG CAC CTT ACA GAA Lys His Asp Ile Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu 340 345	1056
AAT TAT TCG CCG AAT CCG GAT GCG GCT GAA TCA CCA TCG TGT TTT ACC Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ala Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr 355 360	1104
ACT GAT CCA AAC ATC CGA GTT GGT TAC TCG TGT CAA ATT CCG AAA TGT Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Glu Ile Pro Lys Cys 370 375	1152

表 4 22(3)に続く

## 表 4 22(3)

GAC GTG TCA ACT GGA CAA GAT TGT TAT CTT GGC AAT GGC AAA AAC TAC Asp Val Ser Ser Gly Glu Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr 385 390	1200
ATC GGC AAG TTA TCC AAA ACA AGG TCT GGA CTC ACA TGT TCC ATG TCG Met Gly Asn Leu Leu 405	1248
GAC AAG AAT ATG GAG GAT TTA CAC CCG CAT ATC TTC TCG GAG CCA GAC Asp Lys Asn 420	1296
GCT ACG AAG TTC ACT AAG AAT TAC TCG CCG AAC CCG GAT CAG GAC CCG Ala Ser Lys Leu Thr Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala 435 440	1344
CAT GCA CCG TCG TAC ACA GCG AAT CCG CTT CTT TCG GAT TAT His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Val Pro Trp Asp Tyr 450 455	1392
TGC CCG ATT TCC CCG TGT GAA GGA GAT ACT ACA CCG ACA ATT GTC AAT Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn 465 470	1440
TTC GAC CAT CTT GTA ATA TTC TGT GGC AAA ACA AAG CAA CTG GCA GTT Leu Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Glu Leu Arg Val 485 490	1488
GTA AAT GCG ATT CCA ACA GAA ACA GTA GCG TCG ATG GTT AGT TTG Val Asn Gly Ile Pro Thr Glu Thr Thr Val Gly Trp Met Val Ser Leu 500 505	1536
AAA TAC ACG AAT AAA CAC ATC TGT GCG GCA TCA TTC ATA AAG GAA ACT Lys Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu 525	1584
TGC GTT CTT ACT GCA AGC CAA TGT TTT CCA CCG ACA AAC AAA CAG TTG Trp Val Leu Thr Ala Arg Glu Glu Phe Pro Ala Arg Asn Lys Asp Leu 535 540	1632
AAA GAC TAT GAA GGT TCG CTT GCA ATC CAT GAT CTC CAT CAG ACA GCG Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Glu Arg Gly 545 550	1680
GAG GAG AAA CCG AAA CAG ATC TTA AAG ATT TCG CAG CTA CTC TAT GCA Glu Glu Lys Arg 565	1728

表 4 22(4)に続く

## 第 4 図 (4)

CCT GAA GGC TCA GAT TTG GTT TTA CTG AAG CTT GCT GGC CCT GCA ATC 1776  
 Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Leu Lys Leu Ala Arg Pro Ala Ile  
 580 585 590

CTG GAT AAC TTT GTC AGT ACA ATT GAT TTA CCT AGT TAT GGC TGT ACA 1824  
 Leu Asp Asn Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Ser Tyr Gly Cys Thr  
 595 600 605

ATC CCT GAA AAG ACT ACT TGC AGT ATT TAC GGC TGG GGC TAC ACT GGA 1872  
 Ile Pro Glu Lys Thr Thr Cys Ser Ile Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly  
 610 615 620

TTG ATC AAC GCA GAT GGT TTA TTA CGA GTA GCT CAT CTG TAT ATT ATG 1920  
 Leu Ile Asn Ala Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met  
 625 630 635 640

GGC AAT GAG AAA TGC AGT CAG CAC CAT CAA GGC AAG GTG ACT TTG AAT 1968  
 Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His His Gln Gly Lys Val Thr Leu Asn  
 645 650 655

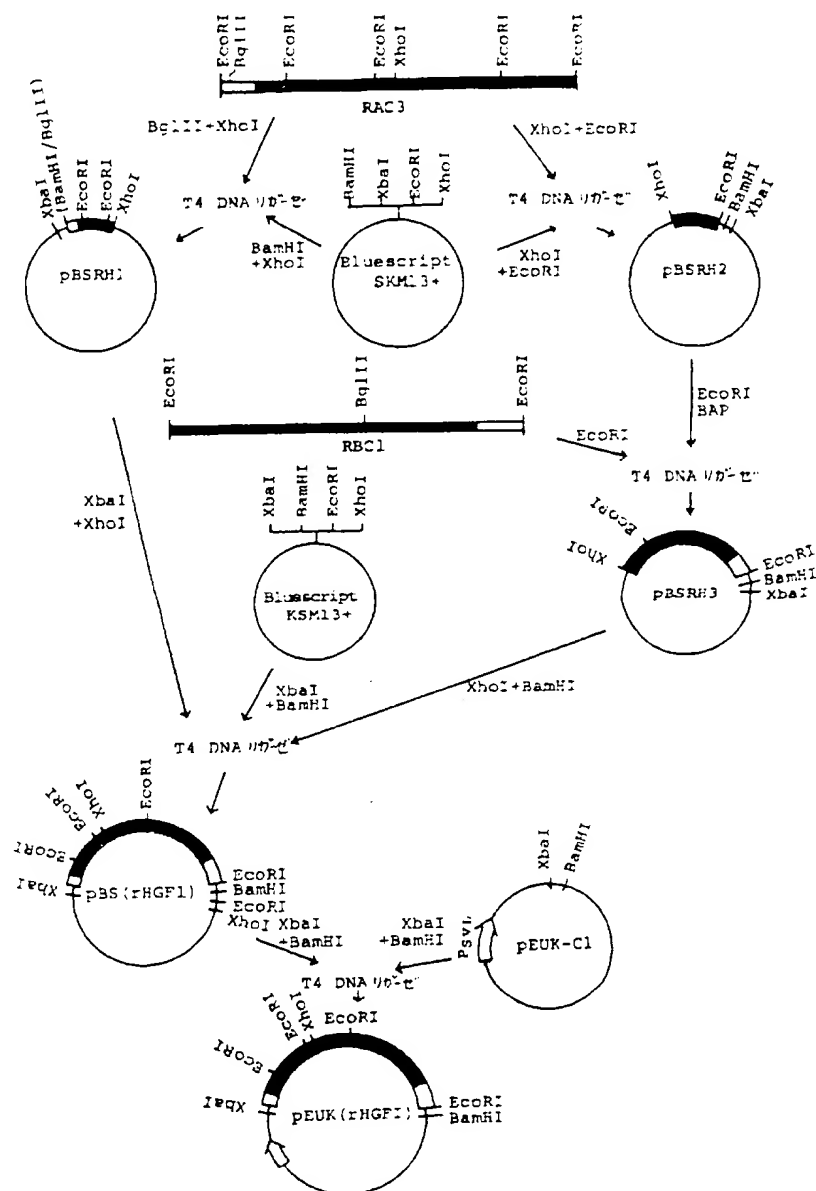
GAG TCT GAA TTA TGT GCT GGC GCT GAA AAG ATT GGA TCA GGA CCT TGT 2016  
 Glu Ser Glu Leu Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys  
 660 665 670

GAG GGA GAT TAT GGT GGC CCA CTC ATT TGT GAA CAA CAC AAA ATG ACA 2064  
 Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Ile Cys Glu Gln His Lys Met Arg  
 675 680 685

ATC GTT CTT GGT GTC ATT GTT CCT GGT GGT GGA TGT GCC ATC CCA AAT 2112  
 Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn  
 690 695 700

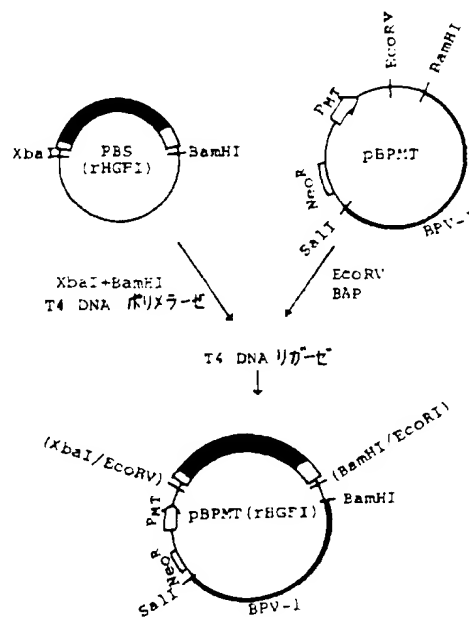
CCT CCT GGT ATT TTT GTT CGA GTA GCA TAT TAT GCA AAA TGG ATA CAC 2160  
 Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His  
 705 710 715 720

AAA GTA ATT TTG ACA TAC AAG TTG TAA  
 Lys Val Ile Leu Thr Tyr Lys Leu \*\*\*  
 725

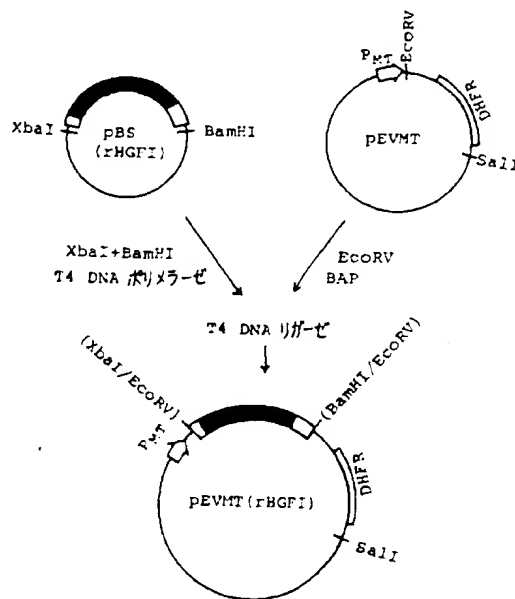


第5図





第6図



第7図

## 第1頁の続き

⑤Int. Cl. *	識別記号	庁内整理番号
A 61 K 45/00		9051-4 C
C 12 N 5/10		
	Z N A	
C 12 P 21/00	H	8214-4 B
// A 61 K 37/02	A C S	8615-4 C
	A D U	8615-4 C
G 01 N 33/574	A	9015-2 J
(C 12 P 21/00		
C 12 R 1:91)		

⑦発明者 萩 屋 道 雄	滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬 研究所内
⑦発明者 清水 伸	滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬 研究所内
⑦発明者 田 代 康 介	福岡県福岡市東区筥松2丁目2-37 第2東寿荘205号室